

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARCELA VALLES LANGE

**ASPECTOS BIOQUÍMICOS DO EFEITO DA FRAÇÃO
SOLÚVEL DO PETRÓLEO EM *Astyanax* sp**

CURITIBA

2007

MARCELA VALLES LANGE

**ASPECTOS BIOQUÍMICOS DO EFEITO DA FRAÇÃO
SOLÚVEL DO PETRÓLEO EM *Astyanax* sp**

Monografia apresentada ao Departamento de
Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas,
Universidade Federal do Paraná, como requisito
parcial à obtenção do título de Bacharel em
Ciências Biológicas,

Orientador: Prof. Dr. Ciro Alberto de Oliveira
Ribeiro

Co-orientador: Dr. Francisco Filipak Neto

CURITIBA

2007

Dedico este trabalho a meus pais, que sempre me incentivaram a estudar e me apoiaram em todos os momentos de dificuldades, com sabedoria e, principalmente, com amor.

AGRADECIMENTOS

Ao
Professor Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro
pelo acolhimento no laboratório, confiança e orientações

A
Francisco Filipak Neto
pela co-orientação, auxílio e paciência indispensáveis

À
Professora Helena Cristina da Silva de Assis
devido à disponibilização dos equipamentos de seu laboratório e também apoio técnico

Ao
Departamento de Bioquímica
pelo empréstimo do espectrofluorímetro

À
Jocieli Maschio
pelo apoio carinhoso e ensinamentos indispensáveis

A
João Ricardo Alves Costa
pelo auxílio na coleta dos peixes

A
Daniel Bussolaro
pela ajuda fundamental na realização dos ensaios bioquímicos

À
Inês da Silva Rabitto
Pelo auxílio na realização dos ensaios e na análise dos dados

Ao
Professor Juarez Gabardo
Pelo auxílio com o tratamento estatístico dos dados

Aos
Amigos do Laboratório de Toxicologia Celular
Alberto, Daniel, Daniele, Fernanda, Fabiane, Flávia, João, Josiane, Inês, Marco Aurélio, Maria Luiza, Maritana, Rafael, Renata, Sônia
Por alegrarem meus dias no laboratório, pelo apoio técnico, confidências e momentos inesquecíveis

Aos
Amigos da faculdade
Diego, Juliana, Larice, Lisandra, Nilton, Thais, Walquíria
Pela companhia maravilhosa e amizade insubstituível e inesquecível durante os quatro anos de curso

RESUMO

Neste estudo, foi utilizada a espécie *Astyanax* sp como modelo de estudo para avaliar a poluição ambiental, através de bioensaios com exposição hídrica aguda a diluições de fração solúvel do petróleo em água (FSA) a 15, 33 e 50%, seguida por um período de depuração. Foram utilizados como biomarcadores a glutatona reduzida, a glutatona-S-transferase e a peroxidação lipídica, com o objetivo de avaliar os efeitos da FSA no equilíbrio óxido-redutor de células do fígado de *Astyanax* sp. Além disso, com o intuito de verificar a biodisponibilidade e a metabolização dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos pelos organismos, foi realizada a detecção desses compostos na bile. Não foram encontradas diferenças significativas nos níveis dos marcadores para as diferentes concentrações de FSA diluída e nem entre essas e o grupo controle. Entre a exposição e a depuração, alguns grupos tiveram seus resultados alterados, mas essa alteração não foi considerada devido a possíveis erros metodológicos e amostrais. Os metabólitos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos na bile demonstraram a possibilidade de uma contaminação do lote de animais utilizados, evidenciando a importância do uso das análises químicas como complemento na avaliação dos efeitos biológicos. A partir do estudo realizado, pôde-se concluir que as diferentes concentrações de FSA diluída, no tempo de exposição estabelecido, não ocasionaram um desequilíbrio redox celular em níveis que impossibilitassem à célula modular ou se adaptar ao estresse. Sendo assim, não foi alcançado estado de estresse oxidativo que não pudesse ser remediado pelos mecanismos de defesa antioxidante da célula.

Palavras-chave: Fração solúvel de petróleo em água. Biomarcadores. Bioensaios. *Astyanax* sp.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01 – <i>Astyanax</i> sp, modelo utilizado nos estudos de bioensaios.....	18
FIGURA 02 – Representação gráfica do design experimental utilizado.....	19
FIGURA 03 - Mortalidade dos peixes durante a exposição.....	26
FIGURA 04 – Mortalidade dos peixes durante a depuração.....	27
FIGURA 05 - Concentração de glutathione reduzida (GSH)	27
FIGURA 06 - Atividade das glutathione-S-transferases (GSTs)	28
FIGURA 07 – Peroxidação lipídica – concentração de hidroperóxidos lipídicos	29
FIGURA 08 – Concentração de HPAs totais nas amostras de bile.....	30
FIGURA 09 – Concentração de cada tipo de HPA (2, 3, 4, 5 e 6 anéis) nas amostras de bile	31

LISTA DE ABREVIações

BSA – Albumina de soro bovina

CAT – Catalase

DTNB – Ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico

EROs – Espécies reativas de oxigênio

FSA – Fração solúvel do petróleo em água

FOX – do inglês *Ferrous Oxidation / Xylenol Orange Method*

GPOX – Glutathione peroxidase

GSH – Glutathione reduzida

GSSG – Glutathione oxidada

GST – Glutathione-S-transferases

HPAs – Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

LPO – Lipoperoxidação

MS222 - ácido-etil éster-3-aminobenzóico

PBS – Tampão fosfato salino

TCA – Ácido tricloroacético

UV – Radiação ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
1.1. A fração solúvel do petróleo (FSA)	9
1.2. Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA's)	10
1.3. Bioindicadores e biomarcadores de contaminação ambiental	11
1.3.1. Ictiofauna como indicadora de qualidade ambiental	12
1.3.2. O uso do bioensaio	12
1.3.3. Biomarcadores químicos do estresse oxidativo	13
1.3.4. Alterações nas estruturas celulares decorrentes do estado oxidativo	15
1.3.5. Detecção de metabólitos de HPA's na bile	15
2. OBJETIVOS	17
2.1. Objetivo geral	17
2.2. Objetivos específicos	17
3. METODOLOGIA	18
3.2. Design experimental	18
3.2.1. Preparo da FSA	19
3.2.2. Preparo dos aquários	20
3.3. Coletas	20
3.4. Ensaio bioquímico:	21
3.4.1. Homogeneização das amostras	21
3.4.2. Quantificação de proteínas totais	21
3.4.3. Conteúdo total de GSH	21
3.4.4. Atividade geral das isoformas de GST	22
3.4.5. Peroxidação lipídica	23
3.5. Detecção de metabólitos de HPA's na bile	24
3.5.1. Quantificação de proteínas na bile	25
3.6. Tratamento estatístico dos dados	25
4. RESULTADOS	26
5. DISCUSSÃO	32
6. CONCLUSÕES	38
7. REFERÊNCIAS	39

1. INTRODUÇÃO

O ambiente aquático sofre constantemente com os efeitos relacionados a despejos de produtos das atividades humanas, sejam eles efluentes domésticos ou industriais, resíduos de fitossanitários ou substâncias originárias de derramamentos e acidentes. Muitos dos componentes desses produtos são persistentes e podem afetar os ecossistemas aquáticos, tais como rios e lagos.

Cada vez mais cresce a preocupação com a preservação e manutenção da qualidade desses ecossistemas, e por isso várias pesquisas têm sido realizadas com o intuito de aprimorar e desenvolver metodologias que possibilitem o estudo e análise do potencial tóxico dos xenobiontes (compostos químicos estranhos aos sistemas biológicos, podendo vir a apresentar grau de toxicidade aos organismos expostos) ao meio biótico natural e também à saúde da população humana. O uso de bioindicadores e biomarcadores de contaminação ambiental surge neste contexto, como uma maneira vantajosa em relação às medidas físicas e químicas da água, sendo ideal, no entanto, trabalhar com os três aspectos conjuntamente.

1.1. A fração solúvel do petróleo em água (FSA)

O petróleo é uma mistura complexa de hidrocarbonetos e compostos orgânicos contendo enxofre, nitrogênio e oxigênio, além de baixas concentrações de compostos orgânicos metálicos, tais como cádmio, chumbo e mercúrio. (PEDROZO *et al.*, 2002). A composição química do petróleo é diferente para cada fonte geográfica de extração (OVERTON *et al.*, 2004), porém de maneira geral, cerca de 75% do petróleo é constituído por hidrocarbonetos de cadeias curtas e longas (NEFF, 1978).

A fração solúvel do petróleo em água (FSA) é uma mistura complexa e altamente volátil de cadeias de hidrocarbonetos (poliaromáticos, heterocíclicos) e fenóis, contendo nitrogênio e enxofre (AKAISHI *et al.*, 2004). Apesar da volatilidade dos compostos mais tóxicos, os peixes podem absorver rapidamente parte da FSA, com conseqüências adversas à organização biológica (COLLIER *et al.*, 1996). Esses danos ocasionados se relacionam a um fenômeno que ocorre na célula exposta a agentes estressores chamado de estresse oxidativo.

1.2. Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA's)

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA's) são moléculas que podem ter origem petrogênica, por serem componentes dos combustíveis fósseis, como o petróleo. São substâncias lipofílicas (FOUCHÉCOURT *et al.*, 1998), e por isso com grande afinidade pelos tecidos animais, formadas por anéis aromáticos arranjados em configurações isoméricas variadas, sendo que alguns destes possuem potenciais efeitos tóxicos para a biota (HOWERTON *et al.*, 2002). Os HPAs de cadeias curtas, mais tóxicos e voláteis, tendem a permanecer por menos tempo no ambiente; os HPAs de cadeias longas tendem a ser mais estáveis (BRAUNER *et al.*, 1999).

A liberação de HPA's no ambiente tem sido reconhecida como um sério problema ambiental nas ultimas décadas, de modo que vários biomarcadores tem sido desenvolvidos para medir a exposição e os potenciais efeitos tóxicos desses componentes na saúde da vida selvagem e, principalmente, dos organismos aquáticos (HURK *et al.*, 2006-b).

Os níveis de HPA's de origem petrogênica estão aumentando nos ambientes marinhos devido à exploração do óleo e seu transporte (HURK *et al.*, 2006-a). Essas moléculas, por serem hidrofóbicas, são movidas rapidamente para os tecidos animais (MARSILI *et al.*, 1997).

Algumas moléculas de HPA's têm efeitos mutagênicos, carcinogênicos e teratogênicos nos organismos (HAUGLAND *et al.*, 2005; MARSILI *et al.*, 1997), outras apresentam efeito narcótico ou ainda, quando combinados com radiação UV, podem provocar um efeito fototóxico (HURK *et al.*, 2006-a). As principais moléculas de HPA's que possuem potencial tóxico são: Benzo(a)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(b)fluoranteno, criseno e benzo(a)antraceno (MARSILI *et al.*, 1997).

Em peixes, os HPA's frequentemente estão associados a mutações, malformações, tumores e câncer (COLLIER *et al.*, 1998), além de alterações fisiológicas e morfológicas nos rins e fígado, hiperplasia nas brânquias e erosão nas nadadeiras (HSU & DENG, 1996). Esses compostos, uma vez absorvidos pelos organismos, são metabolizados numa tentativa de detoxificação, podendo resultar em processos de exaustão celular, tal como o estresse oxidativo (HAUGLAD *et al.*, 2005).

Entre os efeitos descritos no tecido hepático pode-se incluir fibrose, infiltração leucocitária, necrose, neoplasias e lipidoses (AKAISHI *et al.*, 2004; OLIVEIRA RIBEIRO *et al.*, 2005). Dentre os efeitos mais específicos relacionados com a exposição aos HPAs, destaca-se a ação indutora do xileno sobre a atividade das enzimas microsossomais hepáticas com o aumento da concentração do citocromo P-450 e provável lipoperoxidação (ATSDR, 1999).

Os HPAs podem interagir com as membranas, levando a desestruturação e um aumento da superfície e área de contato das membranas celulares. Isto pode resultar na expansão da camada lipídica produzindo alterações estruturais e funcionais na membrana como o aumento da atividade do citocromo c oxidase e o aumento de permeabilidade para compostos de baixo peso molecular e determinados prótons e íons (PEDROZO *et al.*, 2002).

1.3. Bioindicadores e biomarcadores de contaminação ambiental

Uma maneira de se fazer o diagnóstico do potencial tóxico dos xenobiontes e de seus efeitos sobre o ambiente natural é através do uso de bioindicadores e biomarcadores, que vem se tornando cada vez mais freqüente nos últimos anos.

Bioindicadores são definidos como populações que podem indicar os primeiros sinais de estresse ambiental causado por contaminantes em altos níveis de organização biológica (ADAMS, 2002) apresentando características que favoreçam sua utilização na avaliação da saúde de um determinado ecossistema, tais como representatividade da área de estudo, facilidade de identificação e coleta e oferecimento de quantidade suficiente de material biológico. Os biomarcadores, por sua vez, são alterações biológicas a nível molecular, celular e fisiológico que expressam a exposição e o efeito tóxico causado pelos poluentes presentes no ambiente (WALKER *et al.*, 1996), apresentando grande susceptibilidade, boa sensibilidade, relativa especificidade e baixo custo de análise, em comparação à análise química (STEGEMAN *et al.*, 1992; BAINY, 1993).

O bioindicadores são vantajosos em relação às medidas físicas e químicas da água. Os organismos vivos representam as condições ambientais às quais estiveram expostos em toda a sua vida, permitindo detecções de poluição aguda e também crônica, detectam precocemente a existência de contaminação por

substâncias tóxicas biologicamente significativas, avaliam a magnitude da contaminação, determinam o grau de severidade dos efeitos causados pelos contaminantes, possibilitam a consideração de aspectos tais como biomagnificação (transmissão de compostos que não são metabolizados ou excretados pelos organismos para os níveis superiores da cadeia trófica) e sinergismo (efeitos mais pronunciados, quando as substâncias ocorrem simultaneamente), e, ainda, são muito úteis no que diz respeito à consideração da especificidade dos impactos nas diferentes espécies, já que estas apresentam diferentes níveis de sensibilidade e tolerância aos poluentes (STEGEMAN *et al.*, 1992).

1.3.1. Ictiofauna como indicadora de qualidade ambiental

Muitos grupos de organismos têm sido sugeridos e usados como bioindicadores de alterações ambientais e ecológicas (KARR *et al.*, 1986). Os peixes têm sido utilizados com sucesso como indicadores numa ampla variedade de habitats aquáticos (WHITFIELD, 1996; SOTO-GALERA *et al.*, 1998), pois refletem o estado de saúde dos ecossistemas aquáticos em relação à presença de poluentes (CARAJAVILLE *et al.*, 2000; SILVA *et al.*, 2001).

Os peixes apresentam várias vantagens ao serem utilizados como bioindicadores, devido a sua presença em praticamente todos os ecossistemas aquáticos; à existência de informação disponível sobre o ciclo de vida e sobre as respostas ao ambiente para algumas espécies; à facilidade de identificação; à representatividade de vários níveis tróficos por diferentes espécies; à vida relativamente longa, fornecendo registro de longa duração do estresse ambiental; à grande quantidade de formas e guildas funcionais, cobrindo vários componentes do ecossistema aquático afetados pelas perturbações antropogênicas (MASCHIO, 2006).

1.3.2. O uso do bioensaio

O uso do bioensaio contribui com importantes informações para estudos em toxicologia ambiental, sendo ferramenta relevante para o diagnóstico de áreas impactadas. Este método minimiza a influência de variáveis ambientais, possibilitando a obtenção de dados e padronização de metodologias que possam

prever ou avaliar o efeito do contaminante. Apesar de não ser possível extrapolar todos os resultados obtidos integralmente para o ambiente, estes auxiliam na construção de um banco de dados úteis para a compreensão dos fatores que interferem na saúde dos organismos aquáticos e do ambiente em que vivem (AKAISHI, 2003).

1.3.3. Biomarcadores químicos do estresse oxidativo

As células animais produzem constantemente compostos de oxigênio parcialmente reduzidos, como o peróxido de hidrogênio e o íon hidróxido, que são normalmente utilizados como substratos em várias vias metabólicas celulares, havendo um equilíbrio entre produção e consumo. No entanto, a exposição a poluentes pode interferir de maneira direta ou indireta nesse equilíbrio, levando a um excedente de espécies reativas de oxigênio (EROs) na célula, podendo levar a um aumento ou a inibição na atividade dos sistemas enzimáticos de proteção, caracterizando estresse oxidativo.

Vários estudos de biomonitoramento ambiental relacionam o grande aporte de diversas classes de poluentes com a geração de EROs destacando inúmeras conseqüências aos organismos aquáticos e aos seus respectivos ecossistemas (RADI & MATKOVICS, 1988; MALINS *et al.*, 1988; BAINY *et al.*, 1996; TORRES *et al.*, 2002).

São várias as enzimas que têm sua atividade afetada devido à presença das espécies reativas de oxigênio, seja no sentido de auxiliar na detoxificação celular, seja para proteger a célula dessas espécies reativas. Dentre elas estão a Catalase (CAT), a Glutathione Peroxidase (GPOX) e a Glutathione-S-transferase (GST). A glutathione reduzida (GSH) também pode ser usada como biomarcador, por exercer papel na detoxificação celular.

A Catalase (CAT) está presente principalmente nos peroxissomos. Essas organelas contêm enzimas que usam o oxigênio molecular para remover átomos de hidrogênio de substratos orgânicos em reações oxidativas, que produzem peróxido de hidrogênio. A catalase utiliza esse H_2O_2 gerado por outras enzimas na organela para oxidar vários outros substratos, incluindo fenóis, formaldeído e álcoois, através de reações peroxidativas, muito importantes para células do fígado, por exemplo, na eliminação de moléculas tóxicas que entram na corrente sanguínea. Além disso,

quando se acumula um excesso de H_2O_2 na célula, a catalase converte rapidamente duas moléculas de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em $2\text{H}_2\text{O}$ e oxigênio molecular (O_2).

A exposição a poluentes leva à inibição catalítica ou supressão da produção da CAT (expressão gênica) ou de seu grupo prostético (grupo HEME), resultando na “sobra” de H_2O_2 , que reage com componentes celulares, ou origina o radical hidroxila ($-\text{OH}$) (mais reativo). Os mecanismos de resposta antioxidante presente na célula se dão pelo aumento na produção da CAT, detectado *in vitro* por ensaios bioquímicos (aumento da atividade tecidual).

As Peroxidases são enzimas que reduzem uma variedade de peróxidos a seus correspondentes álcoois. A Glutathione peroxidase (GPOX) é a principal peroxidase em peixes e é uma enzima tetramérica citosólica selênio-dependente que emprega GSH como um cofator. Catalisa a redução do H_2O_2 , utilizando a glutathione reduzida (GSH) como co-substrato, produzindo glutathione oxidada (GSSG).

Entre as funções da Glutathione reduzida (GSH) estão dois contrastantes papéis na detoxificação, como um ligante chave de intermediários eletrofílicos, principalmente via atividades da GST, e como um importante antioxidante (Stegeman *et al.*, 1992; Commandeur *et al.*, 1995). GSH reage com compostos eletrofílicos e substitui grupamentos hidrogênio, cloro, nitrogênio e todos os tipos de grupamentos retiráveis. O consumo de GSH devido à limpeza direta de oxirradicais ou como um cofator para a atividade da glutathione peroxidase (GPOX) faz dela um bom medidor de estresse oxidativo (“tampão” oxidativo).

As Glutathione S-transferases constituem um grupo de enzimas detoxificantes solúveis e que catalisam a conjugação da glutathione reduzida (GSH) com uma variedade de moléculas orgânicas endógenas e exógenas. São classificadas como alfa, mi, pi, e teta, de acordo com suas propriedades físicas, químicas e imunológicas. Cada classe de GST pode ser diferentemente induzida por carcinógenos, poluentes ambientais e estresse oxidativo.

1.3.4. Alterações nas estruturas celulares decorrentes do estado oxidativo

O estresse oxidativo faz surgir na célula compostos como o R-O-OH ou o -OH, que iniciam uma série de reações em cadeia envolvendo radicais livres, e estes podem oxidar uma grande variedade de moléculas biológicas. Assim sendo, o estresse oxidativo pode estar relacionado a danos em diversos níveis tais como: mutagênese, carcinogênese, lipoperoxidação e a oxidação e fragmentação de proteínas e carboidratos (SIES, 1985).

Os ácidos graxos polinsaturados das membranas biológicas, são particularmente susceptíveis devido à presença de suas múltiplas ligações duplas de carbono. Sua oxidação leva à destruição dos fosfolipídios da membrana e esta, por conseguinte, perde sua estrutura, fluidez e função original. O estresse oxidativo leva a um evento em cadeia e cíclico, ocorrendo um incremento dos teores de hidroperóxidos lipídicos (R-O-OH) na célula e isso pode ser detectado no tecido como um todo por métodos bioquímicos que quantificam a lipoperoxidação (LPO).

Nas proteínas, por sua vez, pode ocorrer o aparecimento de grupos carbonilas, como grupos aldeídos e cetonas, como consequência de várias reações oxidativas. Essas proteínas carboniladas tendem a ser mais hidrofóbicas e resistentes à proteólise.

Já em nível de material genético, as reações oxidativas podem levar à oxidação da estrutura macromolecular do DNA ou do citoesqueleto, bem como interferir no processo de crescimento-retração do polímero de tubulina, na dinâmica da rede de microtúbulos do fuso mitótico, podendo gerar assim genotoxicidade por alterar a segregação cromossômica.

1.3.5. Detecção de metabólitos de HPA's na bile

Hidrocarbonetos aromáticos, incluindo seus metabólitos, possuem uma forte propriedade fluorescente, o que possibilita medições quantitativas e análises qualitativas de vários compostos que podem ser obtidas através de simples avaliações de fluorescência de amostras de bile (AAS *et al.*, 2000; HURK *et al.*, 2006-a).

A bile é uma mistura de água, eletrólitos, sais biliares, bilerrubina (resultante da quebra de células sangüíneas), pigmentos biliares (bileverdinas), substâncias xenobióticas detoxificadas, resíduos de hormônios esteróides e proteínas biliares. É secretada continuamente no fígado e é armazenada na vesícula biliar, da qual, por meio de contrações, essa substância é excretada para o intestino delgado. Em animais, no período entre as refeições, a bile se acumula na vesícula biliar até que a próxima refeição seja realizada (HURK *et al.*, 2006-b). A secreção biliar é de extrema importância na digestão e absorção de lipídeos, facilitando a ação das lípases no processo digestivo.

Os HPA's são metabolizados principalmente pelo fígado e os metabólitos produzidos podem ser secretados, juntamente com a bile, para a vesícula biliar, onde ficam armazenados até a bile ser lançada no trato intestinal (AAS *et al.*, 2000; RUDDOCK *et al.*, 2003).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

- Avaliar os efeitos da fração solúvel do petróleo em água (FSA) no equilíbrio óxido-reductor em tecidos alvos de *Astyanax* sp, após exposição hídrica aguda.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a presença e grau de estresse oxidativo em células do fígado medindo a atividade da glutathione-S-transferase e o conteúdo de glutathione reduzida;
- Estudar os efeitos do estado oxidativo na estrutura lipídica através da quantificação da lipoperoxidação;
- Verificar a biodisponibilidade e a metabolização dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos através da detecção desses compostos na bile.

3. METODOLOGIA

3.1. Modelo biológico

O gênero escolhido, *Astyanax* sp., pertence à família Characidae, subfamília Tetragonopterinae, ordem Characiformes. Contempla os animais comumente conhecidos como lambaris, peixes de água doce, com escamas, de pequeno porte, raramente ultrapassando 20cm de comprimento total, corpo alongado e um pouco comprimido. Tem ampla distribuição geográfica, desde o Amazonas até o Rio Grande do Sul, e é bastante abundante no ambiente aquático. As espécies são onívoras, alimentam-se de vários itens alimentares vegetais e animais (flores, frutos, sementes, insetos, crustáceos, algas, detritos etc.) e vivem em vários tipos de habitats, estando presente em rios, riachos e corredeiras. Os animais são muito utilizados para consumo humano, constituem a base alimentar para níveis tróficos superiores e se adaptam bem às condições de laboratório, constituindo, portanto, bons bioindicadores.

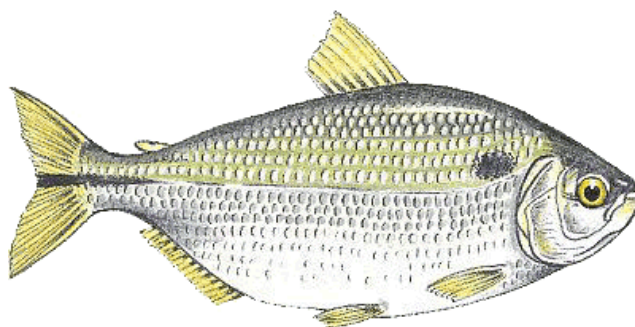


FIGURA 01 – *Astyanax* sp, modelo utilizado nos estudos de bioensaio

FONTE: <http://www.ambientebrasil.com.br> (2007)

3.2. Design experimental

Os exemplares do gênero *Astyanax* sp adultos, provindos de uma estação de piscicultura do município de Araucária, chegaram ao laboratório de Bioensaio e permaneceram por dois dias em período de aclimação, em aquários somente com

água reconstituída (0,0065 g/L de CaCl_2 ; 0,1335 g/L de MgSO_4 ; 0,0004 g/L de KCl ; 0,0105 g/L de NaHCO_3 ; pH7,2 – 7,3). No terceiro dia eles foram expostos à água reconstituída contaminada com a FSA.

Foram dois aquários para cada uma das três concentrações de FSA (15%, 33% e 50%) e para o controle, totalizando oito aquários de 15 litros cada. Em cada aquário foram distribuídos dez indivíduos, totalizando, no início do experimento, oitenta exemplares.

Após 96 horas de exposição, foram coletados os exemplares de um dos dois aquários para cada concentração e para o controle. A metade restante dos aquários passou por mais 96 horas de depuração, depois das quais foi realizada uma nova coleta. Os animais foram anestesiados em MS222 (0,1 g/l) antes de serem sacrificados.

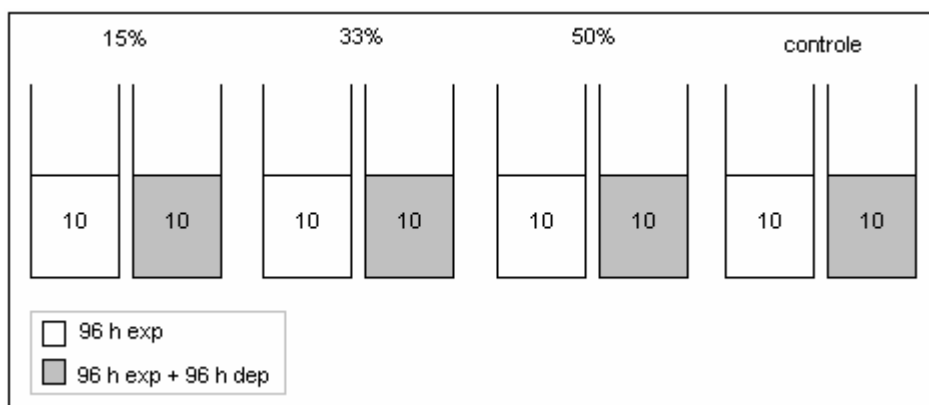


FIGURA 02 – Representação gráfica do design experimental utilizado

Número de exemplares do gênero *Astyanax* sp dispostos em cada um dos dois aquários para o controle e as concentrações de 15, 33 e 50% de FSA ,

Os peixes não foram alimentados durante a aclimação e o período de exposição. A alimentação foi oferecida apenas durante a depuração, na qual ocorreu à vontade.

3.2.1 Preparo da FSA

Para obtenção da fração solúvel do petróleo, uma mistura de água reconstituída, previamente preparada, e petróleo, na proporção de 9:1, foi agitada durante um período de 20 horas, em um recipiente de vidro provido de torneira. Essa

agitação foi realizada através de agitador magnético. Terminado o período de agitação, a água, já com a fração solúvel do petróleo nela solubilizada, que por ser mais densa decantava na parte inferior do recipiente, era retirada pela torneira e guardada em recipientes de vidro. Os vidros eram preenchidos na sua quase totalidade, bem vedados e cobertos com papel alumínio, de modo que não houvesse espaço para a volatilização e nem fosse permitida a ocorrência de fotodegradação. Esses cuidados garantiam a manutenção adequada dos componentes solúveis do petróleo, muito susceptíveis à volatilização e fotodegradação, até o momento de seu uso.

3.2.2 Preparo dos aquários

Os aquários com as diferentes concentrações de FSA foram preparados misturando-se a FSA e água reconstituída, nas proporções adequadas para que se obtivessem as concentrações de 0, 15, 33 e 50%. Havia sistema de aeração, mas não foram utilizados filtros, para não interferir na concentração de exposição. Os aquários permaneceram dentro da capela, devido à volatilidade da FSA.

3.3. Coletas

Após a exposição hídrica, os exemplares foram coletados e deles foram retirados o fígado e a vesícula biliar.

O fígado foi imediatamente armazenado em tubos do tipo *ependorf* e congelado em freezer a -80°C , para posterior homogeneização. A vesícula foi perfurada e a bile foi armazenada, em *pools* de três indivíduos, em frascos de vidro âmbar, permanecendo congelada em freezer a -20°C .

3.4. Ensaios bioquímicos:

3.4.1. Homogeneização das amostras

Para que se pudessem obter as alíquotas a serem utilizadas nos ensaios bioquímicos, as amostras de fígado foram homogeneizadas em tampão fosfato salino (PBS), centrifugadas a 9.000 xg, a 4°C, por 20 minutos, e delas retiraram-se 170 µl do sobrenadante para cada uma das alíquotas necessárias aos ensaios.

3.4.2. Quantificação de proteínas totais

A quantificação de proteínas totais das alíquotas foi feita para que os dados obtidos nos ensaios bioquímicos pudessem ser normalizados. Utilizou-se, para a quantificação, o método de BRADFORD, 1976.

Em microplaca, adicionaram-se 10 µl das alíquotas descongeladas provenientes das amostras homogeneizadas e centrifugadas, seguidos de 250 µl do reativo de *Bradford*. Para a montagem de uma curva padrão de BSA (albumina de soro bovina), também foi adicionado em microplaca BSA nas concentrações de 0, 125, 250, 500 e 1000 µg de BSA por mililitro de volume final de solução (diluição em PBS), seguidos também do reativo de *Bradford*. Procederam-se as leituras de absorbância ($\lambda = 620$ nm; faixa de leitura = 595-620).

A concentração de proteínas foi determinada com base nos valores provenientes de curva-padrão de BSA. A partir de uma equação de primeiro grau representativa da curva padrão, calculou-se as concentrações de proteínas das alíquotas, através de suas absorbâncias.

3.4.3. Conteúdo total de GSH

Para conteúdo total de GSH, utilizou-se um método baseado em SEDLAK e LINDSAY, 1968.

As alíquotas foram descongeladas. Para cada 150 µl de alíquota, foram adicionados 30 µl de ácido tricloroacético (TCA) a 50 % para precipitação protéica após centrifugação a 1000 x g por 15 min a 4°C.

Para que as leituras pudessem ser realizadas, foram adicionados 50 µl do sobrenadante da amostra e 230 µl de tampão Tris-base (400 mM, pH 8,9) a uma microplaca. Como branco foram utilizados 230 µl do tampão Tris-base a 400 mM e 50 µl de TCA a 8% em PBS. Por último, 20 µl de DTNB (ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico) a 2,5 mM (em metanol a 25%, tampão Tris-base 300 mM, pH 8,9) foram rapidamente acrescentados e procederam-se imediatamente as medidas de absorbância ($\lambda = 415$ nm).

A determinação do conteúdo de GSH fez-se com base nos valores da curva padrão de GSH (0; 0,625; 1,25; 2,5; 5 e 10 µM de GSH).

Para o cálculo, utilizou-se a seguinte fórmula:

$$[\text{GSH}] = \text{Abs} \times \text{diluição} \times (\alpha \times d^{-1} \times [\text{proteínas}])^{-1}$$

Onde:

[GSH] está em micromoles de GSH por miligrama de proteínas

Abs = valor de absorbância registrado ($\lambda = 415$ nm), descontado do valor do branco

α = coeficiente angular da curva-padrão (curva de 1º grau passando por x=0; y=0)

d = caminho óptico (para 300 µl nos micropoços) ~ 0,9 cm

[proteínas] = concentração de proteínas totais em miligrama por mililitro

3.4.4. Atividade geral das isoformas de GST

A atividade geral das GSTs foi determinada pelo método de KEEN *et al.*, com modificações. O princípio do método é de que a GST catalisa a reação do substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) com o GSH, formando um tioéter que pode ser monitorado pelo aumento da absorbância a 340 nm.

As alíquotas foram descongeladas. O volume de 50 µl das alíquotas (concentração de proteínas entre 600 e 1000 µg/ml) foi adicionado a uma microplaca e, imediatamente antes da leitura, 100 µl do meio de reação (GSH a 2,0 mM, CDBN a 2,5 mM, etanol a 4%, tampão fosfato de potássio a 100 mM, pH 6,5) foram rapidamente acrescentados, seguindo padronização estabelecida por ROSSI (2006). Em paralelo, foi feito um branco somente com PBS e meio de reação.

O aumento gradual na absorbância foi registrado em intervalos de 12 s durante 2 min, para posterior seleção do primeiro intervalo de 1 min com $r^2 \geq 0,99$ para o cálculo do Δ absorbância por minuto.

Para que pudessem ser feitos os cálculos, foi empregada a seguinte formula:

$$\text{Atividade das GST} = \Delta \text{Abs. min}^{-1} \times \text{diluição} \times \epsilon^{-1} \times d^{-1} \times [\text{proteínas}]^{-1}$$

Onde:

Atividade global das GST está em micromoles por minuto por miligrama de proteínas
 $\Delta \text{Abs. min}^{-1} = |\text{Absorbância final} - \text{Abs. inicial}|$, sendo que o intervalo final menos o inicial é de 1 min

d = caminho óptico (para 150 μl nos micropoços) $\sim 0,45$ cm

ϵ = coeficiente de extinção molar ($\lambda = 340$ nm) em pH = 6,5 para o CDNB = $9,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

$[\text{proteínas}]$ = concentração de proteínas totais em miligrama por mililitro

3.4.5. Peroxidação lipídica

O método utilizado para medição de peroxidação lipídica foi o de FOX (JIANG *et al.*, 1992), cujo princípio é o monitoramento colorimétrico da transição do metal ferro do estado ferroso (Fe^{2+}) para o estado férrico (Fe^{3+}), o que muda a cor do corante xilenol laranja associado, após doação de um elétron para o hidroperóxido tecidual (R-O-OH), com a formação de H_2O e R-OH. A oxidação do Fe^{2+} é mediada por peróxidos sob condições ácidas.

As alíquotas foram descongeladas. Em tubos do tipo eppendorf, adicionaram-se 150 μl da alíquota e mais 1 ml de meio de reação (metanol – grau HPLC - a 90%, 100 μM xilenol laranja, 25 mM H_2SO_4 , 4 mM BHT e 250 μM $\text{FeSO}_4 \cdot \text{NH}_4$). Após 30 min de reação, a temperatura ambiente, nos tubos tampados para reduzir a evaporação de metanol, foi realizada centrifugação a 1.000 xg por 5 minutos. Em microplaca, adicionaram-se 300 μl do sobrenadante e procedeu-se a medida de absorbância ($\lambda = 570$ nm, faixa de leitura = 550-570 nm). Em paralelo às amostras, 150 μl de PBS, mais o meio de reação, foram empregados como branco.

Para que os cálculos fossem realizados, foi utilizada a seguinte formula:

$$[\text{Hidroperóxidos}] = \text{Abs.} \times \text{diluição} \times e^{-1} \times d^{-1} \times [\text{proteínas}]^{-1}$$

Onde:

[Hidroperóxidos] em micromoles de hidroperóxidos por miligrama de proteínas

Abs. = valor de absorbância registrado (l = 570 nm) após descontar o valor do “branco”

e = coeficiente de extinção molar aproximado para H₂O₂, hidroperóxido de cumeno ou

hidróxido de butila (l = 560 nm) = $4,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

d = caminho óptico (para 300 µl nos micropoços) ~ 0,9 cm

[proteínas] = concentração de proteínas totais em miligrama por mililitro

3.5. Detecção de metabólitos de HPA's na bile

As amostras de bile coletadas foram analisadas para quantificação e qualificação de hidrocarbonetos de acordo com o método de fluorescência de comprimento de onda fixo (FF).

Do momento da coleta até o da análise, as amostras foram congeladas em freezer a -20°C em vidro âmbar para evitar a fotodegradação das moléculas.

Inicialmente, foi montada uma curva de padronização para hidrocarbonetos com 2, 3, 4, 5 e 6 anéis. Os hidrocarbonetos com 2 anéis correspondem ao naftaleno, os de 3 anéis abrangem cinco moléculas distintas, uma das quais o fenantreno, os de 4 anéis incluem quatro possíveis moléculas, dentre as quais o pireno e o criseno, os de 5 anéis correspondem a quatro moléculas cabíveis, incluindo o benzo[a]pireno, e os de 6 anéis englobam duas possíveis composições moleculares, sendo uma delas o benzo[ghi]perileno). A curva foi montada nas concentrações 0,078 ng/ml, 0,156 ng/ml, 0,312 ng/ml, 0,6 ng/ml, 0,625 ng/ml, 1,25 ng/ml, 2,5 ng/ml e 5 ng/ml, diluídas em metanol 48%. Montou-se também uma curva de padronização das diluições de uma amostra padrão de bile (obtida pela mistura de *pools*) em metanol 48% , visando eliminar os efeitos de filtro interno causados por outros compostos presentes na bile que também possuem propriedades fluorescentes, nas seguintes proporções de bile para metanol: 1:1000, 1:1200, 1:1400, 1:1600, 1:1800 e 1:2000.

Após obtido o valor de diluição adequado para as amostras, estas foram diluídas em metanol 48% e procederam-se as leituras nos comprimentos de excitação e emissão próprios para detecção de cada tipo de HPA.

3.5.1 Quantificação de proteínas na bile

A quantificação de proteínas totais das amostras de bile foi feita para que os dados obtidos no ensaio de quantificação de metabólitos de HPAs pudessem ser normalizados. Utilizou-se, para a quantificação, o método de BRADFORD, 1976.

Em microplaca, adicionaram-se 10 µl das amostras descongeladas (diluição de 5 vezes), seguidos de 250 µl do reativo de *Bradford*. Para a montagem de uma curva padrão de BSA (albumina de soro bovina), também foi adicionado em microplaca BSA nas concentrações de 0, 125, 250, 500 e 1000 µg de BSA por mililitro de volume final de solução (diluição em água destilada), seguidos também do reativo de *Bradford*. Foi feito ainda um branco constituído de água destilada e amostra de bile. Procederam-se as leituras de absorbância ($\lambda = 620$ nm; faixa de leitura = 595-620).

A concentração de proteínas foi determinada com base nos valores de provenientes da curva-padrão de BSA. A partir de uma equação de primeiro grau representativa da curva padrão, calculou-se as concentrações de proteínas das amostras, através de suas absorbâncias.

3.6. Tratamento estatístico dos dados

Para comparar os dados bioquímicos obtidos para cada grupo (controle, 15%, 33% e 50% de FSA), na depuração e na exposição, e também para comparar as médias antes e após o período de depuração, foi realizada uma Análise de Variância (ANOVA) com delineamento inteiramente casualizado e parcelas dispostas no esquema fatorial. Sempre que os dados foram significativos (valor de F), complementou-se a análise com o teste de Tukey para médias.

Já para a análise dos dados obtidos no ensaio de quantificação de HPAs na bile, utilizou-se de teste T pareado, para comparar as concentrações do mesmo tipo

de hidrocarboneto (2, 3, 4, 5 ou 6 anéis) antes e após a depuração, e teste T não pareado e teste de Wilcoxon para comparar as médias das concentrações do mesmo tipo de hidrocarboneto nos diversos grupos (controle, 15%, 33% e 50% de FSA). Todos os testes foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

Durante a primeira coleta, foram sacrificados nove exemplares do grupo controle, nove do grupo 15%, dez do grupo 33% e nove do grupo 50% de FSA diluída, totalizando trinta e sete exemplares. Sete indivíduos morreram durante a exposição. A mortalidade foi maior nas primeiras 55 horas de exposição, sendo que o grupo que apresentou maior número de mortes foi o 33% de FSA (Figura 03). A segunda coleta constituiu-se de oito exemplares do grupo controle, oito do grupo 15%, dez do grupo 33% e oito do grupo 50% de FSA diluída, totalizando trinta e quatro exemplares. Dois indivíduos morreram durante a o período de depuração. A mortalidade foi menor que a observada durante a exposição, mas também se concentrou no período inicial de 55 horas, sendo que só foi constatada para os grupos controle e 15% de FSA diluída (figura 04).

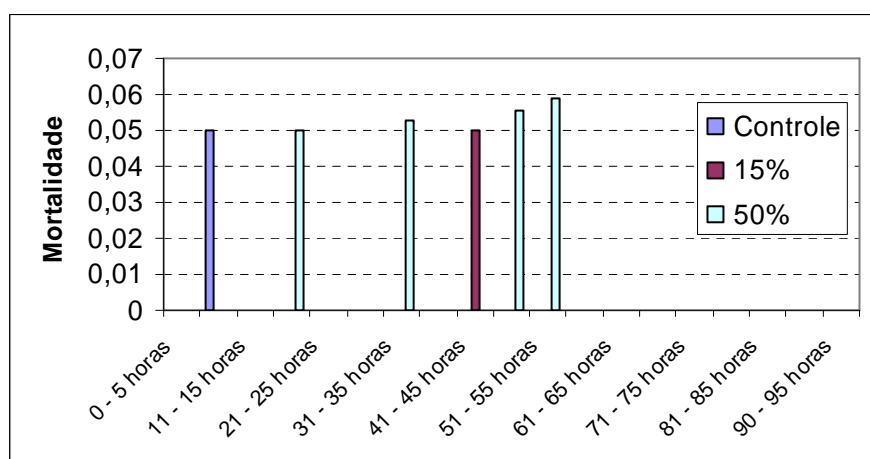


FIGURA 03 - Mortalidade dos peixes durante a exposição

Proporção de mortes em relação ao número de indivíduos vivos do gênero *Astyanax* sp utilizados no bioensaio até o momento da ocorrência

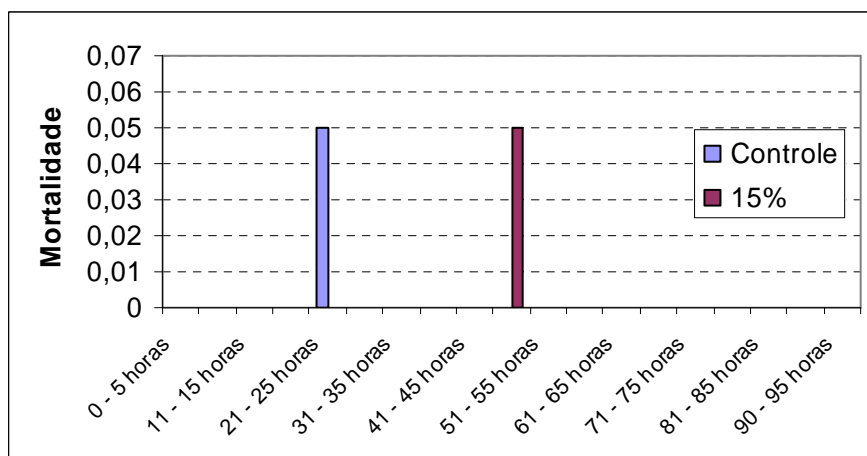


FIGURA 04 – Mortalidade dos peixes durante a depuração

Proporção de mortes em relação ao número de indivíduos vivos do gênero *Astyanax* sp utilizados no bioensaio até o momento da ocorrência

Com relação à concentração de glutathiona reduzida (GSH), não foi encontrada diferença significativa entre os resultados dos grupos (controle, 15%, 33% e 50% de FSA diluída) em ambas as exposição e depuração (Figura 05). Entre a exposição e a depuração, no entanto, houve redução nos níveis de GSH para os grupos controle e 15% de FSA diluída.

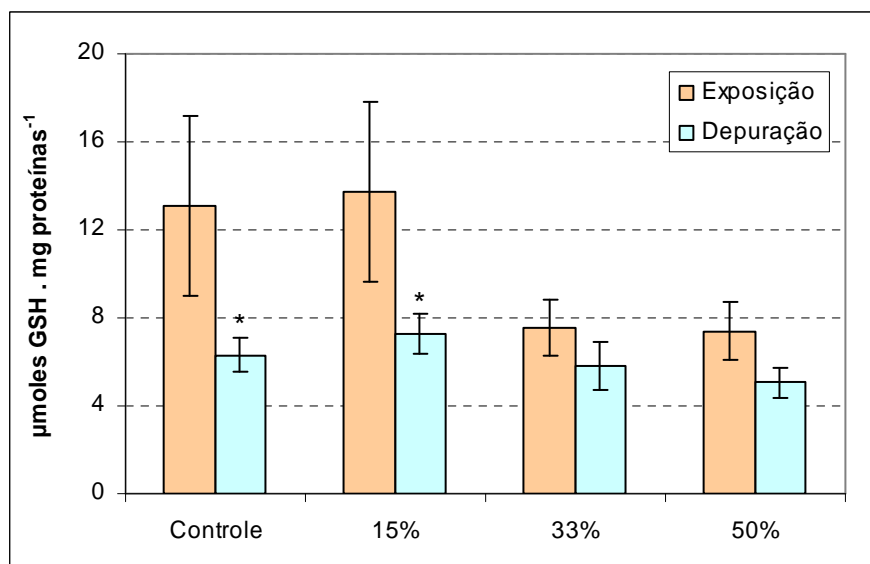


FIGURA 05 - Concentração de glutathiona reduzida (GSH)

Média \pm erro padrão da média. Concentração em micromoles de GSH por miligrama de proteínas totais. Número de indivíduos: exposição = 37 (Controle = 9; 15% = 9; 33% = 10; 50% = 9); depuração = 34 (Controle = 8; 15% = 8; 33% = 10; 50% = 8). * Média de depuração significativamente diferente da de exposição, para a mesma concentração de FSA.

A quantificação da atividade das glutathiona-S-transferase resultou em diferenças significativas para os grupos 15% e 50% de FSA diluída da depuração, com relação ao controle (Figura 06). Nesses dois grupos (15% e 50% de FSA) a atividade das enzimas mostrou-se aumentada, numa magnitude de 35% e 42%, respectivamente. No grupo 33% de FSA observou-se uma diminuição significativa da atividade na depuração, com relação à exposição (24%). Entre os demais grupos não houve diferença estatisticamente significativa.

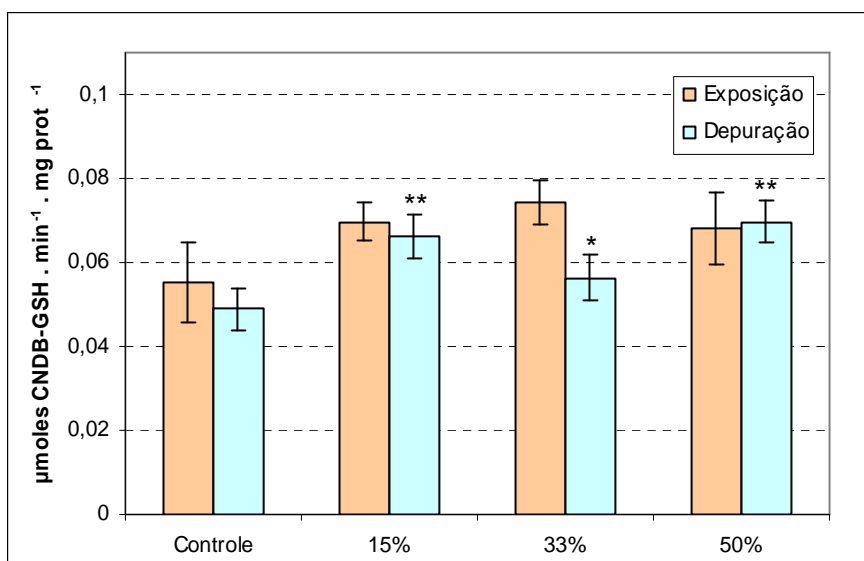


FIGURA 06 - Atividade das glutathiona-S-transferases (GSTs)

Média \pm erro padrão da média. Atividade em micromoles do tioéter GSH-CDNB formado por minuto por miligrama de proteínas totais. Número de indivíduos: exposição = 37 (Controle = 9; 15% = 9; 33% = 10; 50% = 9); depuração = 34 (Controle = 8; 15% = 8; 33% = 10; 50% = 8). * Média de depuração significativamente diferente da de exposição, para a mesma concentração de FSA. ** Média significativamente diferente da do grupo controle.

O ensaio de peroxidação lipídica (LPO) resultou em valores semelhantes estatisticamente, tanto entre os grupos da exposição, quanto entre os grupos da depuração (Figura 07). Comparando os valores de LPO encontrados na exposição com aqueles encontrados na depuração, houve diferença significativa para o grupo 15% e para o 33% de FSA diluída, nos quais os valores da depuração se mostraram significativamente maiores que os da exposição (63% e 83%, respectivamente).

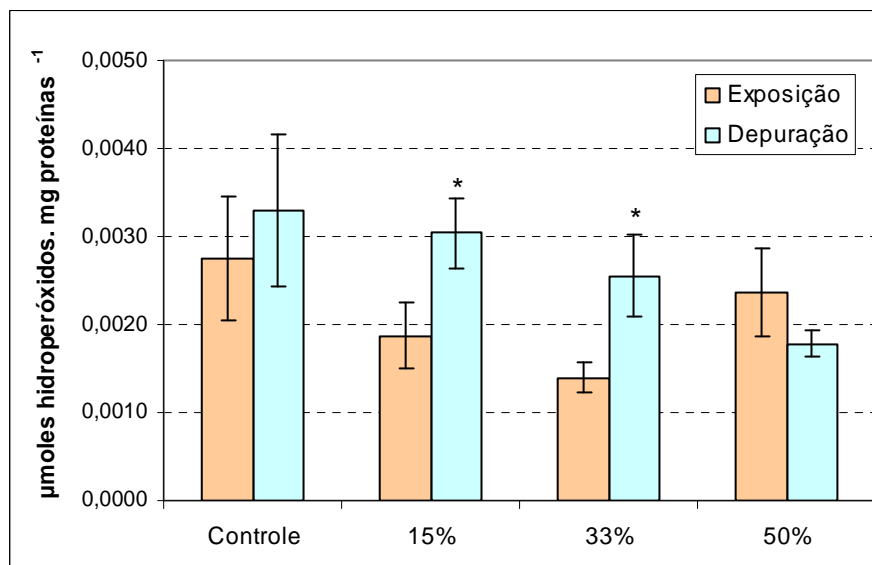


FIGURA 07 – Peroxidação lipídica – concentração de hidroperóxidos lipídicos

Média \pm erro padrão da média. Concentração em micromoles de hidroperóxidos por miligrama de proteínas totais. Número de indivíduos: exposição = 37 (Controle = 9; 15% = 9; 33% = 10; 50% = 9); depuração = 34 (Controle = 8; 15% = 8; 33% = 10; 50% = 8). * Média de depuração significativamente diferente da de exposição, para a mesma concentração de FSA.

No que diz respeito à quantificação de HPAs na bile, os cinco tipos de compostos mensurados (hidrocarbonetos de 2, 3, 4, 5 e 6 anéis) foram identificados na bile dos animais. A diluição escolhida para a leitura das amostras de bile foi de 1:2500, ou seja, uma parte de bile para 2500 partes de solvente (metanol 48%).

Quanto à concentração de HPAs totais nas amostras de bile (Figura 08), observou-se concentração significativamente maior nos grupos 15% e 50% de FSA, em comparação ao controle, tanto na exposição quanto na depuração. Para os valores do grupo 33% não se pode afirmar nada, já que a estimativa ultrapassou os limites de detecção.

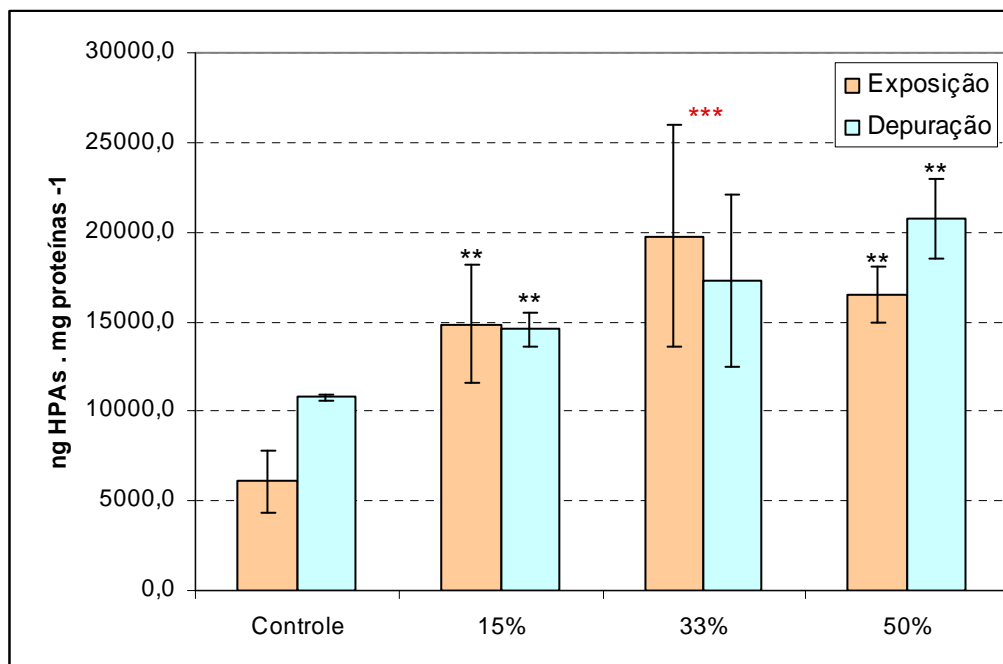


FIGURA 08 – Concentração de HPAs totais nas amostras de bile

Média \pm erro padrão da média. Concentração em nanogramas de HPAs por miligrama de proteínas totais. Número de indivíduos: exposição = 37 (Controle = 9; 15% = 9; 33% = 10; 50% = 9); depuração = 34 (Controle = 8; 15% = 8; 33% = 10; 50% = 8). ** Média significativamente diferente da do grupo controle. *** Ultrapassaram os limites de detecção.

A concentração encontrada para cada tipo de HPA nas amostras de bile (2, 3, 4, 5 e 6 anéis) está representada na Figura 09. Com relação à concentração dos HPAs de dois anéis, que correspondem ao naftaleno, de três anéis, correspondendo, por exemplo, ao fenantreno, e de quatro anéis, tais como o pireno e o criseno, os grupos contaminados apresentaram todas concentrações maiores que as do controle, tanto na exposição quanto na depuração. Hidrocarbonetos de cinco anéis, tendo como representante o benzo-(a)-pireno, e de seis anéis, tais como o benzo(ghi)perileno, não tiveram concentração significativamente maior em nenhum dos grupos contaminados, com relação ao controle, seja na exposição ou na depuração. Entre as concentrações diferentes de FSA diluída, no entanto, os valores encontrados mostraram-se estatisticamente semelhantes.

Comparando os valores encontrados para um mesmo grupo, após a exposição e após a depuração, apenas no grupo 50% de FSA observou-se diferença significativa. A concentração de hidrocarbonetos de dois anéis mostrou-se diminuída após a depuração e a de HPAs de cinco anéis mostrou-se, por outro lado, aumentada após a depuração, em relação à exposição.

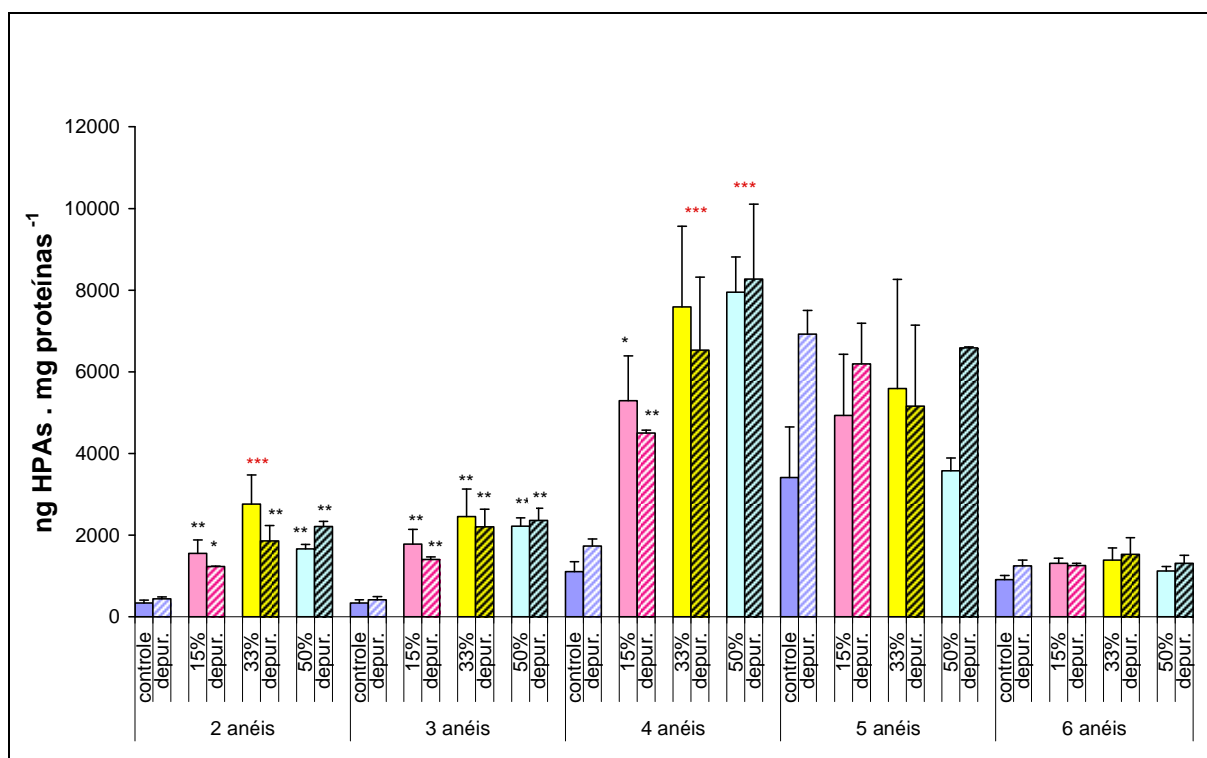


FIGURA 09 – Concentração de cada tipo de HPA (2, 3, 4, 5 e 6 anéis) nas amostras de bile

Média \pm erro padrão da média. Concentração em nanogramas de HPAs por miligrama de proteínas totais. Número de indivíduos: exposição = 37 (Controle = 9; 15% = 9; 33% = 10; 50% = 9); depuração = 34 (Controle = 8; 15% = 8; 33% = 10; 50% = 8). * Média de depuração significativamente diferente da de exposição, para a mesma concentração de FSA ** Média significativamente diferente da do grupo controle. *** Ultrapassaram os limites de detecção.

5. DISCUSSÃO

O estresse oxidativo, em resposta à exposição a poluentes, pode ser observado através de mudanças nos mecanismos de defesa antioxidante (e.g. conteúdo de GSH e a atividade das GSTs), na tentativa de restabelecer o balanço das espécies reativas de oxigênio (EROs) e outras em determinado tecido (Y. Yin *et al.*, 2007). Vários estudos demonstram a relação da exposição de peixes a poluentes, com a indução da produção de EROs e, conseqüente, a presença do estresse oxidativo, e a possibilidade de monitoramento desse estado através da quantificação de marcadores associados com os mecanismos de defesa antioxidante (CAMARGO *et al.*, 2006; GRAVATO *et al.*, 2006; PARVEZ *et al.*, 2006; STEPHENSEN *et al.*, 2000; ZHANG *et al.*, 2005). Especificamente com relação aos HPAs, estimativas do estado oxidativo através do monitoramento destes parâmetros também tem sido extensivamente utilizadas em diversos trabalhos (YIN *et al.*, 2007; SHALLAJA e D'SILVA, 2003; JEE e KANG, 2005; . CORREIA *et al.*, 2007).

Numa situação fisiológica normal, o excesso de EROs é removido por sistemas de defesa antioxidante (LIVINGSTONE, 2001). No caso de ocorrência de estresse oxidativo leve, a defesa antioxidante pode ser induzida como uma resposta compensatória; no entanto, um estresse oxidativo severo pode suprimir as atividades dessas enzimas e levar ao dano oxidativo (YIN *et al.*, 2007).

A glutathiona reduzida (GSH) é um tripeptídeo ubiquitinado contendo tiol de baixo peso molecular que desempenha um importante papel nas reações de detoxificação por conjugação com intermediários eletrofílicos sob a ação catalítica das enzimas antioxidantes (YIN *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2004). GSH é geralmente a primeira linha de defesa contra o estresse oxidativo (ZHANG *et al.*, 2004). Além de atuar na redução de hidroperóxidos orgânicos (ROOH) pelas GSTs (ARTEEL e SIES, 2001), participa da redução do próprio peróxido de hidrogênio (H_2O_2) nas reações catalisadas pelas glutathiona peroxidases (GPx) (FILIPAK NETO *et al.*, 2007). Outra função da GSH é que ela age como um importante antioxidante para remoção de EROs através da oxidação de GSH a GSSG (glutathiona oxidada). Pode-se observar duas respostas no caso da exposição a contaminantes: a redução ou o aumento no conteúdo de GSH. Por sua vez, três razões podem causar a diminuição do conteúdo de GSH: conjugação da GSH com hidrocarbonetos tais como o

fenantreno, para ação catalítica das GSTs; GSH agindo como um reagente celular redutor e protegendo contra as mudanças cíclicas redox celulares induzidas por substâncias tóxicas; e perda de mecanismos adaptativos quando da ocorrência de estresse oxidativo severo. Já o aumento dos níveis de GSH está relacionado com a remoção dos radicais hidroxila, devido a um mecanismo adaptativo em reação ao estresse oxidativo por um aumento de sua síntese (YIN *et al.*, 2007).

Os valores de concentração de GSH encontrados, no entanto, não demonstraram diferenças significativas entre os diferentes grupos (controle, 15%, 33% e 50% de FSA diluída). Esse resultado pode significar que o estresse oxidativo tenha ocorrido em taxas muito reduzidas, de modo que não tenha chegado a ativar significativamente o sistema antioxidante GSH, ou que outros mecanismos antioxidantes, tais como a catalase e a superóxido-dismutase, independentes de GSH, tenham sido suficientes para manter a homeostase celular.

Após o período de depuração, foi encontrada uma redução significativa nos níveis de GSH para os grupos controle e 15% de FSA diluída. Essa ocorrência, no entanto, deve estar relacionada à grande variabilidade intraespecífica associada a algum aspecto metodológico ou amostral. Já que as concentrações de FSA não estão, de acordo com a falta de efeito significativo na exposição, afetando o balanço redox celular. Não é coerente pensar que na depuração haja alteração de atividade enzimática, e portanto, os resultados não foram entendidos como verdadeiras alterações, mas sim como conseqüências desses aspectos metodológicos e amostrais.

As GSTs são uma família de enzimas multicompostas envolvidas na fase II da detoxificação de muitos xenobióticos, desempenhando um importante papel na proteção dos tecidos do estresse oxidativo (FOURNIER *et al.*, 1992; PESONEN *et al.*, 1999; PARIS-PALACIOS *et al.*, 2000; VAN DER OOST *et al.*, 2003). Um papel importante das GSTs é obviamente a defesa contra o dano oxidativo e produtos peroxidativos de DNA e lipídios (GEORGE, 1994). Elas catalisam a conjugação de diversos compostos eletrofílicos com a glutatona reduzida (OLSEN *et al.*, 2001). A atividade das GSTs pode ser aumentada ou reduzida, após exposição a poluentes. O aumento na atividade das GSTs tem sido associado com a adaptação defensiva do organismo à presença de uma variedade de compostos orgânicos no meio ambiente (GALLAGHER *et al.*, 2001) e pode ser uma adaptação metabólica à exposição a altas concentrações de contaminantes, como uma defesa contra os

danos oxidativos (YIN *et al.*, 2007). O aumento da atividade das GSTs hepáticas foi relatado em muitas outras publicações após a exposição a HPAs, PCBs (bifenilas policloradas) e pesticidas (VAN DER OOST *et al.*, 2003). Por outro lado, a diminuição da atividade das GSTs pode estar relacionada a uma exposição muito ofensiva a um determinado poluente, levando à perda dos mecanismos adaptativos atuantes em uma exposição menos severa.

Assim sendo, após a exposição às concentrações de FSA, esperava-se que fosse encontrada uma das duas situações: indução ou supressão da atividade das GSTs. Após o período de exposição, no entanto, não foi observada diferença significativa entre os diferentes grupos (controle, 15%, 33% e 50% de FSA). Isso corrobora a hipótese de que não estaria acontecendo estresse oxidativo em taxa significativa. Após a depuração, contudo, observou-se um aumento da atividade dessas enzimas nas concentrações de 15% e 50% de FSA, com relação ao grupo controle. E para o grupo 33% de FSA, observou-se diminuição significativa na atividade das GSTs após a depuração, com relação à exposição. Esses resultados, no entanto, não foram conclusivos, já que não explicam a ausência de aumento da atividade, na depuração, com relação ao controle, para a concentração de 50% de FSA diluída, bem como a ausência de diminuição na atividade após a depuração nos demais grupos que não o de 33% de FSA diluída.

A atividade de LPO é considerada como um dos melhores biomarcadores de estimativa de risco ecológico (VAN DER OOST *et al.*, 2003). Sua importância está em iniciar o processo de dissolução da membrana celular, deixando as células expostas a fatores xenobióticos (MURIEL, 1997). Muitos poluentes ambientais e seus metabólitos têm mostrado exercer efeitos tóxicos associados ao estresse oxidativo, produzindo radicais livres que iniciam a LPO e causam dano às proteínas de membrana (ORUÇ e ÜNER, 2000; GUTTERIDGE, 1995). Muitos estudos mostraram o aumento da peroxidação lipídica em organismos aquáticos expostos a altas concentrações de poluentes (THOMAS e WOFFORD, 1984; GABRYELAK e KLEKOT, 1985; VIARENGO *et al.*, 1989; RIBERA *et al.*, 1991). Vários estudos, ainda, têm mostrado aumentos nos valores de atividade de LPO em peixes expostos a contaminantes (TEJEDA-VERA *et al.*, 2007; PARVEZ *et al.*, 2006; WILHELM FILHO *et al.*, 2001; GRAVATO *et al.*, 2006). A peroxidação lipídica é uma consequência muito importante do estresse oxidativo causado pelo metabolismo de hidrocarbonetos (CORREIA *et al.*, 2007). SHI *et al.* (2005) demonstraram que a

peroxidação lipídica está fortemente relacionada à geração de EROs em peixes expostos ao naftaleno.

O decréscimo de antioxidantes não enzimáticos e enzimáticos pode levar a um desbalanço redox significativo, que acaba por gerar a LPO (GRAVATO *et al.*, 2006). A glutatona reduzida é considerada um dos agentes antioxidantes mais importantes envolvidos na proteção das membranas celulares da LPO através da remoção de radicais de oxigênio (levando à formação da glutatona dissulfeto, GSSG) (MEISTER, 1989). PARVEZ *et al.* (2006) encontrou uma baixa taxa de GSH após o derramamento de petróleo, o que estaria relacionado ao aumento da LPO nos tecidos de *Anguilla anguilla* durante um episódio de derramamento de óleo. A depleção da GSH hepática, assim como a diminuição das atividades da GR, CAT, GPx e GST parecem ser os principais mecanismos de resposta levando a um aumento da LPO (PARVEZ *et al.*, 2006).

Os resultados do ensaio de LPO não demonstraram diferenças significativas entre os diferentes grupos. Esse resultado corrobora a hipótese de ausência de estresse oxidativo em nível relevante. O grupo 33% de FSA, entretanto, apresentou aumento da atividade de LPO na depuração, com relação à exposição. Isso poderia parecer contraditório à hipótese vigente, mas o aumento da atividade de LPO não precisa necessariamente estar relacionado a danos nas atividades das defesas antioxidativas - como concluiu COSSU *et al.* (2000), cuja sugestão foi de que o aumento da LPO não pode ser previsto com base na depleção de antioxidantes.

Os HPAs, de maneira geral, depois de absorvidos - por meio da ingestão, difusão pela superfície corporal ou troca gasosa - são eficientemente metabolizados nos vertebrados por enzimas, as quais aumentam a solubilidade desses compostos na água, permitindo sua excreção (HAUGLAND, 2005; HURK *et al.*, 2006). Após metabolizados, esses compostos encontram-se concentrados e são excretados via bile. A vesícula biliar é a maior rota de excreção de HPAs em peixes. Como resultado, a análise dos metabólitos na bile de peixes constitui um método bastante sensível para avaliação de exposição aos HPAs (AAS *et al.*, 1998; JONSSON *et al.*, 2004).

O nível de metabólitos de HPAs na bile é, independente da exposição a HPAs, influenciado pelo fluxo de bile através da vesícula biliar (DAMASIO *et al.*, 2007). A regulação desse é principalmente dependente das condições de alimentação do organismo já que a bile é usada como uma secreção da digestão

(COLLIER e VARANASI, 1991). Por isso, foi importante controlar a condição de alimentação dos peixes no período do experimento, para minimizar variações intra-específicas no conteúdo de bile.

Outros estudos também identificaram a detecção por fluorescência de metabólitos de HPAs na bile como um método sensível e de custo viável para detecção de contaminação por óleo. HELLOU e UPSHALL (1995) expuseram linguados a diferentes concentrações de óleo em sedimento e encontraram uma boa associação entre as concentrações do sedimento e níveis de metabólitos de HPAs na bile medidos por fluorescência. Em experimentos dose-resposta com petróleo, diversos autores encontraram boas correlações entre as concentrações de exposição hídrica e os níveis de metabólitos na bile (BRITVIC *et al.*, 1993; CAMUS *et al.*, 1998; AAS *et al.*, 2000).

A identificação dos metabólitos de HPAs na bile dos peixes contaminados já era esperada, pela presença desses compostos na constituição da fração solúvel do petróleo, disponibilizando HPAs para absorção pelo organismo e conseqüentemente sua metabolização. A solubilidade dos hidrocarbonetos de petróleo na água depende da polaridade de suas moléculas, sendo que os hidrocarbonetos aromáticos são mais solúveis em água em relação aos hidrocarbonetos parafínicos com o mesmo número de átomos de carbono (PEDROZO *et al.*, 2002).

A concentração de hidrocarbonetos de dois, três e quatro anéis mostrou-se aumentada nos grupos contaminados. No entanto, entre as diferentes concentrações de FSA diluída, não se observaram diferenças significativas. Isso pode estar relacionado à existência de um limite de absorção pelos organismos, de modo que concentrações mais altas do contaminante não alterassem a quantidade de HPAs absorvida. Pode haver também relação com uma velocidade máxima de metabolização dos hidrocarbonetos, tal que, em concentrações maiores de FSA, os animais não tenham conseguido, nos tempos de exposição e depuração, metabolizar todo o contaminante, mas precisassem de mais tempo para isso.

Já com relação à ausência de diferenças nas concentrações de metabólitos de HPAs com cinco e seis anéis entre o grupo controle e os contaminados, pode-se imaginar que os peixes já estivessem contaminados com tais compostos no local de origem. Os benzo-a-pirenos, por exemplo, tem origem pirogênica, além da petrogênica, ou seja, não necessariamente provêm de contaminações por derivados do petróleo, mas podem originar-se também de combustões incompletas. Assim, a

estação de piscicultura da qual vieram os animais poderia facilmente estar contaminada.

Essa hipótese de um lote contaminado, já sob o efeito de hidrocarbonetos de cinco e seis anéis, torna possível a suposição de que os animais já estariam adaptados à condição de estresse oxidativo, e, assim sendo, os biomarcadores bioquímicos utilizados passam a não mais ser uma boa ferramenta para a análise, neste caso.

6. CONCLUSÕES

A partir do estudo realizado, pode-se concluir que:

- As diferentes concentrações de FSA diluída, no tempo de exposição estabelecido, não ocasionaram um desbalanço redox celular em taxa relevante, de modo que não chegou a ser alcançado o estado de estresse oxidativo e, conseqüentemente, não foram ativadas as defesas antioxidantes mensuradas.
- Os resultados obtidos também permitem concluir que o uso das análises químicas na avaliação dos efeitos biológicos é de grande importância, já que foram os dados originários dessas análises que permitiram o melhor entendimento das causas relacionadas à ausência de estresse oxidativo observável através dos biomarcadores de contaminação utilizados.
- A possibilidade de o lote de animais utilizados no experimento já estar sob o efeito de hidrocarbonetos com cinco e seis anéis torna viável uma prévia adaptação à condição de estresse, e assim os biomarcadores bioquímicos utilizados perdem em qualidade e relevância para a análise. Por isso, para próximos estudos seria essencial uma mudança na estação de piscicultura fornecedora dos exemplares.
- Também para estudos posteriores, outra alteração importante a ser feita seria o aumento do número amostral, de modo a diminuir o erro da média, que foi bastante elevado para certos grupos de alguns ensaios, prejudicando a obtenção de resultados conclusivos.

7. REFERÊNCIAS

AAS, E.; BEYER, J.; GOKSOYR, A. PAH in fish bile detected by fixed wavelength fluorescence. *Marine Environmental Research*, v.46, n°1-5, pp.225-228, 1998.

AAS, E.; BEYER, J.; GOKSOYR, A. Fixed wavelength fluorescence (FF) of bile as a monitoring tool for polyaromatic hydrocarbon exposure in fish: an evaluation of compound specificity, inner filter effect and signal interpretation. *Biomarkers*, v.5, n°1, pp.9-23, 2000.

AAS, E.; BAUSSANT, T.; BALK, L.; LIEWENBORG, B.; ANDERSEN, O. K. PAH metabolites in bile, cytochrome P4501A and DNA adducts as environmental risk parameters for chronic oil exposure: a laboratory experiment with Atlantic cod. *Aquatic Toxicology*, v.51, pp.241–258, 2000.

ADAMS, M. Biological Indicators of aquatic Ecosystem Stress. American Fisheries Society, 2002.

AKAISHI, F. M. Avaliação do potencial tóxico da fração solúvel do petróleo em água (FSA) em *Astyanax* sp. utilizando biomarcadores de contaminação. Dissertação de mestrado. Curitiba, 2003.

AKAISHI, F.M., SILVA DE ASSIS, H.C., JAKOBI, S.C.G., STJEAN, S., COUTERNAY, S.C., LIMA, E., WAGNER, A.L.R., SCOFIELD, A., OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. Morphological and neurotoxicological findings in tropical freshwater fish (*Astyanax* sp.) after waterborne and acute exposure to water soluble fraction (WSF) of crude oil. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v.46, pp.244–253, 2004.

ATSDR – AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. Total petroleum hydrocarbons. 1999. Disponível em: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxpro2.html>. Acesso em: 18 de nov. 2007.

BAINY, A. C. D. How to evaluate the safety chemical substances in aquatic environments. *Ciência e Cultura*, v.45, pp.10-11, 1993.

BAINY, A.C.D.; SAITO, E.; CARVALHO, P.S.M.; JUNQUEIRA, V.B.C. Oxidative stress in gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. *Aquatic Toxicology*, v. 34, pp.151-162, 1996.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v.72, pp.248-254, 1976.

BRAUNER, C.J.; BALLANTYNE, C.J.; VIJAYAN, M.M.; VAL A.L. Crude oil exposure affects air-breathing frequency, blood phosphate levels and ion regulation in an air-breathing teleost fish, *Hoplosternum littorale*. *Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, n°123, pp. 127–134, 1999.

BRITVIC, S.; LUCIC, D.; KURELEC, B. Bile fluorescence and some early biological effects in fish as indicators of pollution by xenobiotics. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v.12, pp.765–773, 1993.

CAJARAVILLE, M. P.; BEBIANO, M. J.; BLASCO, J.; PORTE, C.; SARASQUETE, S. & VIARENGO, A. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *The Science of Total Environment*, v.247, pp.295-311, 2000.

CAMARGO, M.M.P.; MARTINEZ, C.B.R. Biochemical and physiological biomarkers in *Prochilodus lineatus* submitted to in situ tests in an urban stream in southern Brazil. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v.21, pp.61–69, 2006.

CAMUS, L.; AAS, E.; BORSETH, J.F. Ethoxyresorufin-O-deethylase activity in fixed wavelength fluorescence detection of PAHs metabolites in bile in turbot (*Scophthalmus maximus* L.) exposed to a dispersed topped crude oil in a continuous flow system. *Marine Environmental Research*, v.46, pp.29–32, 1998.

COLLIER, T.K.; VARANASI, U. Hepatic activities of xenobiotic metabolizing enzymes and biliary levels of xenobiotics in English sole (*Parophrys vetulus*) exposed to environmental contaminants. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v.20, pp.463–473, 1991.

COLLIER, T. K.; CRONE, C. A.; KRAHN, M. G.; STAIN, J. E.; CHAN, S. L.; VARANASI, U. Petroleum exposure and associated biochemical effects in subtidal fish after the Exxon Valdez oil spill. *American Fisheries Society Symposium*, v.18, pp.671-683, 1996.

COLLIER, T. K.; JOHNSON, L. L.; STEHR, C. M.; MYERS, M. S. & SETEIN, J. E. A comprehensive assessment of the impacts of contaminants on fish from an urban waterway. *Marine Environmental Research*, v.46, pp.243-247, 1998.

CORREIA, A. D.; GONÇALVES, R.; SCHOLZE, M.; FERREIRA, M.; HENRIQUES, M. A. Biochemical and behavioral responses in gilthead seabream (*Sparus aurata*) to phenanthrene. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v.347, pp.109–122, 2007.

COSSU, C.; DOYOTTE, A.; BABUT, M.; EXINGER, A.; VASSEUR, P. Antioxidant biomarkers in freshwater bivalves, *unio tumidus*, in response to different contamination profiles of aquatic sediments. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.45, pp.106–121, 2000.

DAMASIO, J. B.; BARATA, C.; MUNNEB, A.; GINEBRED, A.; GUASCH, H.; SABATER, S.; CAIXACH, J.; PORTE, C. Comparing the response of biochemical indicators (biomarkers) and biological indices to diagnose the ecological impact of an oil spillage in a Mediterranean river (NE Catalunya, Spain). *Chemosphere*, v.66, pp.1206–1216, 2007.

FILIPAK NETO, F. Avaliação citotóxica em hepatócitos de *Hoplias malabaricus* expostos a misturas complexas de pesticidas, MeHg e DDT. Dissertação de doutorado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2007.

FOUCHÉCOÜRT, M.O.; ARNOLD, M.; BERNY, P.; VIDEMANN, B.; RETHER, B.; RIVIÉRE, J.L. Assessment of the bioavailability of PAHs in rats exposed to a polluted soil by natural routes: induction of EROD activity and DNA adducts and PAH burden in both liver and lung. USA: Environmental Research, v.80, pp.330–339, 1998.

FOURNIER, D., Bride, J.M., Poirie, M., Berge, J.B., Plapp, F.W. Insect glutathione S-transferases. Biochemical characteristics of the major forms of houseflies susceptible and resistant to insecticides. Journal of Biological Chemistry, v.267, pp.1840–1845, 1992.

GABRYELAK, T; KLEKOT, J. The effect of paraquat on the peroxide metabolism enzymes in erythrocytes of freshwater fish species. Comparative Biochemistry and Physiology, pp.81:415–8, 1985.

GALLAGHER, E.P., GROSS, T.S., SHEEHY, K.M. Decreased glutathione S-transferase expression and activity and altered sex steroids in Lake Apopka brown bullheads (*Ameiurus nebulosus*). Aquatic Toxicology, v.55, pp.223–237, 2001

GEORGE, S. G. Enzymology and molecular biology of phase II xenobioticconjugating enzymes in goldfish. In; Malins, D.C., Ostrander, G.K. (Ed.), Aquatic Toxicology; Molecular, Biochemical and Cellular perspectives. Lewis Publishers, CRC press, pp.37–85, 1994.

GRAVATO, C.; TELES, M.; OLIVEIRA, M.; SANTOS M. A. Oxidative stress, liver biotransformation and genotoxic effects induced by copper in *Anguilla anguilla* L. – the influence of pre-exposure to b-naphthoflavone. Chemosphere, v.65, pp.1821–1830, 2006.

GUTTERIDGE, J. M. C. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. Clinical Chemistry, v.41(12), pp.1819–28, 1995.

HAUGLAND, C.; UGLAND, K. I.; BORSETH, J. F.; AAS, E. Polycyclic aromatic hydrocarbons in capelin (*Mallotus villosus*) in the Barents Sea by use of fixed wavelength fluorescence measurements of bile samples. Marine Pollution Bulletin, v.50, pp.95-104, 2005.

HELLOU, J.; UPSHALL, C. Monocyclic aromatic hydrocarbon in bile of flounder exposed to a petroleum oil. Int. J. Environmental Analytical Chemistry, v.60, pp.101–111, 1995.

HOWERTON, S.B.; GOODPASTER, J.V.; MCGUFFIN, V.L. Characterization of polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental samples by selective fluorescence quenching. USA: Analytica Chimica Acta, n°459, pp.61–73, 2002.

HSU, T. & DENG, F. Studies on the susceptibility of various organs of zebrafish (*Brachydanio rerio*) to benzo(a)pyrene-induced DNA adduct formation. Chemosphere, v.50, n°10, pp.1975-1980, 1996.

HURK, P. (a) Bile fluorescence, heme oxygenase induction, and increased biliverdin excretion by mistures of environmental toxicants. Aquatic Toxicology, v.77, pp.202-209, 2006.

HURK, P. (b) Heme oxygenase induction and biliverdin excretion: implications for the bile fluorescence biomarker. *Marine Environmental Research*, Short Communication, v.62, pp.S16-S19, 2006.

JEE, J.H.J., KANG, C. Biochemical changes of enzymatic defense system after phenanthrene exposure in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Physiological Research*, v.54, pp.585–591, 2005.

JONSSON, G.; SUNDT, R. C.; AAS, E. BEYER, J. An evaluation of two fluorescence screening methods for the determination of chrysene metabolites in fish bile. *Chemosphere*, v.56, pp.81-90, 2004.

KARR, J. R.; FAUSCH, K. D.; ANGERMIER, P. L; YANT, P. R & SCHLOSSER, I. J. Assessing biological integrity in running waters, a method and its rationale. *Nat. Hist. Surv. Spec. Public.*, v.5, p.28, 1986.

KODO, A. Katsumiti. Uso de biomarcadores de contaminação ambiental na avaliação do impacto do vazamento de óleo derivado de petróleo em ecossistemas de água doce. Dissertação de mestrado na área de ecologia e conservação, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

LIVINGSTONE, D.R. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Marine pollution bulletin*, v.42, pp. 656–666, 2001.

MALINS, D.C.; MCCAIN, B.B.; LANDAHL, J.T.; MYERS, M.S.; KRAHN, M.M.; BROWN, D.W.; CHAN, S.; ROUBAL, W.T. Neoplastic and other diseases in fish in relation to toxic chemicals: an overview. *Aquatic Toxicology*, v.11, pp.43-67, 1988.

MARSILI, L.; FOSSI, M. C.; CASINI, S.; SAVELLI, C.; JIMENEZ, B; JUNIN, M.; CASTELLO, H. Fingerprint of polycyclic aromatic hydrocarbons in two populations of southern sea lions (*Otaria flavescens*). *Chemosphere*, v.34, nº4, pp.759-770, 1997.

MASCHIO, J. Uso de biomarcadores químicos e morfológicos no estudo de biodisponibilidade e efeito tóxico de hidrocarbonetos em *Astyanax* sp. e *Salvelinus alpinus*. Monografia de graduação na área de Biologia Celular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

MEISTER, A. On the biochemistry of glutathione. In: Taniguchi N, Higashi T, Sakamoto S, Meister A, editors. *Glutathione Centennial. Molecular Perspectives and Clinical Implications*. San Diego: Academic Press, pp.3–22, 1989.

MURIEL, P. Peroxidation of lipids and liver damage. In: Baskin SI, Salem H, editors. *Oxidants, antioxidants and free radicals*. Washington, USA: Taylor & Francis, pp.237–57, 1997

NEFF, H. M. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment sources, fates and biological effects. *Applied Science Publisher Ltd*. Essex UK, 1978.

OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; VOLLAIRE, Y; SANCHEZ-CHARDI, A., ROCHE, H. Bioaccumulation and the effects of organochlorine pesticides, PAH and heavy metals in

the eel (*Anguilla anguilla*) at the Carmague Nature Reserve, France. *Aquatic Toxicology*, v.74, pp.53-69, 2005.

OLSEN, T., ELLERBECK, L., FISHER, T., CALLAGHAN, A., CRANE, M. Variability in acetylcholinesterase and glutathione S-transferase activities in *Chironomus riparius meigen* deployed in situ at uncontaminated field sites. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v.20, pp.1725–1732, 2001

ORUÇ, E. Ö., ÜNER. Combined effects of 2,4-D and azinphosmethyl on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in liver of *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, C*, pp.127:291–6, 2000.

OVERTON, E.B.; ASHTON, B.M.; MILES, M.S. Historical Polycyclic aromatic and petrogen hydrocarbon loading in Northern Central Gulf of Mexico shelf sediments. USA: *Marine Pollution Bulletin*, v. 49, pp. 557– 563, 2004.

PARIS-PALACIOS, S., BIAGIANTI-RISBOURG, S., VERNET, G. Biochemical and (ultra) structural hepatic perturbations of *Brachydanio rerio* (Teleostei, Cyprinidae) exposed to two sublethal concentrations of copper sulfate. *Aquatic Toxicology*, v.50, pp.109–124, 2000.

PARVEZ, S.; PANDEY, S.; ALI, M.; RAISUDDIN, S. Biomarkers of oxidative stress in *Wallago attu* (Bl. and Sch.) during and after a fish-kill episode at Panipat, Índia. *Science of the Total Environment*, v. 368, pp. 627–636, 2006.

PEDROZO, M. F. M.; BARBOZA, E. M.; CORSEUIL, H. X.; SCHNEIDER, M. R.; LINHARES, M. M. *Ecotoxicologia e avaliação do risco do petróleo*. Salvador: Centro de Recursos Ambientais, 2002.

RADI, A.A.R.; MATKOVICS, B. Effects of metal ions on the antioxidant enzyme activities, protein content and lipid peroxidation of carptissues. *Biochemical Physiology*, v. 90, pp.60-72, 1988.

RIBERA, D.; NARBONNE, J. F.; MICHEL, X.; LIVINGSTONE, D. R.; O'HARA, S. Responses of antioxidant and lipid peroxidation in mussels to oxidative damage exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology, C*; pp.100:177–81, 1991.

ROSSI, S. C. *Uso de biomarcadores para detecção de efeitos subletais de herbicidas em Astyanax sp (Teleostei)*. Dissertação de Mestrado em Farmacologia, Universidade Federal do Paraná, 2006 (a ser defendida em 2008).

RUDDOCK, P. J.; BIRD, D. J.; McEVOY, J.; PETERS, L. D. Bile metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH's) in European eels *Anguilla anguilla* from United Kingdom estuaries. *The Science of the Total Environment*, v.301, pp.105-117, 2003.

SHI, H.H.; SUI, Y.X.; WANG, X.R.; LUO, Y.; JIA, L.L. Hydroxyl radical production and oxidative damage induced by cadmium and naphthalene in liver of *Carassius auratus*. *Comparative Biochemistry and Physiology.*, v.140 C, pp.115–121, 2005.

SHALLAJA, M.S., D'SILVA, C. Evaluation of impact of PAH on a tropical fish, *Oreochromis mossambicus* using multiple biomarkers. *Chemosphere*, v.53, pp.835–841, 2003.

SIES, H. Oxidative stress: Introductory remarks Academic Press, London, UK. In: SIES, H. Oxidative Stress, London: Academic Press, pp.1-8, 1985.

SILVA, C. A. R.; RAINBOW, P. S.; SMITH, B. D. & SANTOS, Z. L. Biomonitoring of trace metal contamination in the Potengi estuary, Natal (Brazil), using the oyster *Crassostrea rhizophorae*, a local food source. *Water Research*, v. 35, nº17, pp.4072-4078, 2001.

SOTO-GALERA, E.; DIAZ-PARDO, E.; LOPEZ-LOPEZ, E. & LYONS, J. Fish as indicators of environmental quality in the Rio Lerma Basin, México. *Aquatic Ecosystem Health and Management*, v.1, pp.267-276, 1998.

STEGEMAN, J. J.; HINTON, D. E.; WOODIN, B.; SMOLOWITZ, R.; OKIHIRO, M. & VAN HELD, P. A.. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In: Biomarkers. Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress. Huggett, R. J., Kimerle, R. A., Mehrle Jr., P. P. & Bergman, H. L. Eds. Lewis Publishers, pp.235-335, 1992.

STEPHENSEN, E.; STURVE, J.; FORLIN, L. Effects of redox cycling compounds on glutathione content and activity of glutathione-related enzymes in rainbow trout liver. *Comparative Biochemistry and Physiology*, C 133, pp.435–442, 2002.

TEJEDA-VERA, R.; LÓPEZ-LÓPEZ, E.; SEDEÑO-DÍAZ, J. E. Biomarkers and bioindicators of the health condition of *Ameca splendens* and *Goodea atripinnis* (Pisces: Goodeidae) in the Ameca River, México *Environment International*, v.33, pp.521–531, 2007.

THOMAS, P., WOFFORD, H. W. Effects of metal and organic compounds on hepatic glutathione, cysteine and acid-soluble thiol levels in mullet (*Mugil cephalus* L.). *Toxicology and Applied Pharmacology*; pp.76:172–82, 1984.

TORRES, M.A.; TESTA, C.P.; GÁSPARI, C., Oxidative stress in the mussel *Mytella guyanensis* from polluted mangroves on Santa Catarina Island, Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, v. 44, pp. 923 – 932, 2002.

VAN DER OOST, R., BEYER, J., VERMEULEN, N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v.13, pp.57–149, 2003

VIARENGO, A; ARENA, N.; PERTICA, M.; CANESI, I.; MARTINO, G.; GASPA, L. Effect of copper on microtubule structure in the gill cells of metalexposed mussels. *Marine Environmental Research*, 28:pp.453–4, 1989.

WALKER, C. H.; HOPKIN, S. P.; SIBLY, R. M. & PEAKALL, D. B. Principles of Ecotoxicology. Taylor & Francis, Londres, pp.321, 1996.

WHITFIELD, A. K. Fishies and environmental status of South African estuaries. *Fisheries Management and Ecology*, v.3, pp.45-57, 1996.

WILHELM, D. F.; TRIBESS, T.; GASPARI, C.; CLÁUDIO, F.D.; TORRES, M.A.; MAGALHAES, A. R. M. Seasonal changes in antioxidant defenses of the digestive gland of the brown mussel (*Perna perna*). *Aquaculture*, pp.203:149–58, 2001.

YIN, Y.; JIA, H.; SUN, Y.; YU, H.; WANG, X., Wu, J.; XUE, Y. Bioaccumulation and ROS generation in liver of *Carassius auratus*, exposed to phenanthrene. *Comparative Biochemistry and Physiology, C*, v. 145, pp.288–293, 2007.

ZHANG, J., SHEN, H.; WANG, X.; Wu, J.; XUE, Y. Effects of chronic exposure of 2,4-dichlorophenol on the antioxidant system in liver of freshwater fish *Carassius auratus*. *Chemosphere*, v.55, pp.167–174, 2004.

ZHANG, J. F.; LIUB, H.; SUNB, Y. Y.; WANGB, X. R.; WU, J. C.; XUE, Y. Q. Responses of the antioxidant defenses of the Goldfish *Carassius auratus*, exposed to 2,4-dichlorophenol. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v.19, pp.185–190, 2005.